

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/04, 1/37	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/38995 (43) Date de publication internationale: 5 août 1999 (05.08.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00166</p> <p>(22) Date de dépôt international: 28 janvier 1999 (28.01.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/00917 28 janvier 1998 (28.01.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy l'Etoile (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): ORENGA, Sylvain [FR/FR]; Saint-André-Le-Bas, F-01160 Neuville sur Ain (FR).</p> <p>(74) Mandataire: TONNELIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: USE OF INDOLAMINE DERIVATIVES FOR DETECTING MICRO-ORGANISM PEPTIDASE</p>		
<p>(54) Titre: DERIVES D'INDOLAMINE DANS LA DETECTION DE PEPTIDASES DE MICRO-ORGANISMES</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns compounds of formula X-NH-R wherein X represents an indole-3-yl group optionally substituted and R represents in particular an acyl residue of an amino acid or of a peptide, enabling to detect a peptidase activity in a micro-organism culture medium, including in a gelled medium, by forming a stain or fluorescence in said medium. The invention is particularly useful for detecting micro-organisms.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Des composés de formule X-NH-R dans laquelle X représente un groupe indole-3-yle éventuellement substitué et R représente notamment le reste acyle d'un acide aminé ou d'un peptide, permettent de détecter une activité de peptidase dans un milieu de culture de micro-organismes, y compris en milieu gélifié, par formation d'une coloration ou d'une fluorescence dans ledit milieu. Application notamment à la détection de micro-organismes.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

DERIVES D'INDOLAMINE DANS LA DETECTION DE PEPTIDASES DE MICRO-ORGANISMES

5 La présente invention concerne l'utilisation d'au moins un composé à base d'un dérivé d'indolamine pour la mise en évidence d'une activité d'aminopeptidase ou de peptidase dans une culture de micro-organismes, ainsi qu'un procédé et un milieu de culture pour révéler une telle
10 activité enzymatique, ou pour identifier des micro-organismes exprimant ou n'exprimant pas cette activité.

On appelle généralement aminopeptidase une enzyme capable de cliver par hydrolyse le groupement amide formé entre un acyle d'acide aminé et une amine primaire, et on
15 appelle peptidase une enzyme capable de cliver par hydrolyse le groupement amide formé entre le reste acyle d'un peptide et une amine primaire. Dans la présente demande, le terme "peptidase" peut désigner, selon les cas, aussi bien une peptidase telle que définie précédemment
20 qu'une aminopeptidase.

La détection et l'identification des micro-organismes sont très importantes notamment en médecine, dans l'industrie agro-alimentaire, et pour la surveillance de l'environnement (par exemple le contrôle de l'eau). Les
25 micro-organismes peuvent être recherchés pour leur pathogénicité, comme indicateurs de contamination, ou dans le contrôle de procédés de fabrication.

Les techniques de détection et d'identification de micro-organismes sont actuellement basées sur la recherche
30 de séquences nucléotidiques caractéristiques, sur la recherche d'antigènes ou d'anticorps, sur la culture en milieu sélectif ou non sélectif, ou encore sur la recherche

d'activités métaboliques et notamment enzymatiques (par exemple activités d'osidases, d'estérases, de peptidases, d'oxydases, etc.).

Le plus souvent, les procédés de détection et
5 d'identification des micro-organismes associent plusieurs de ces techniques. La culture est ainsi utilisée pour multiplier et sélectionner les micro-organismes recherchés. Afin de simplifier leur détection, il a été proposé de mettre en évidence des activités biochimiques en
10 introduisant directement dans le milieu de culture des molécules produisant une coloration ou une fluorescence. De tels milieux sont appelés milieux de détection. Les activités biochimiques recherchées peuvent être mises en évidence par diverses méthodes telles que :

15 - la modification physico-chimique du milieu : par exemple changement de pH. révélé à l'aide d'un indicateur coloré ou fluorescent (méthyl-umbelliférone),

- le changement du potentiel redox révélé à l'aide d'un indicateur coloré (sel de tétrazolium) ou fluorescent,

20 - la réaction d'une molécule produite par les micro-organismes avec un composé présent dans le milieu, conduisant à une coloration,

- ou encore l'hydrolyse de molécules libérant un composé coloré ou fluorescent (naphtol, coumarine).

25 Les hydrolyses détectées sont en général le résultat de l'action d'une enzyme produite par le micro-organisme sur un substrat enzymatique naturel ou synthétique. Ces activités enzymatiques sont par exemple celles des enzymes suivantes : estérases (par exemple lipases, phosphatases),
30 osidases (β -galactosidase, β -glucuronidase, N-acétyl-hexosaminidase), peptidases (alanine-aminopeptidase, trypsinase, gélatinase), DNases, décarboxylases,

désaminases, uréases, tryptophanases, oxydases, catalases, etc.

On sait par ailleurs que les milieux gélifiés sont particulièrement bien adaptés à la culture et à l'isolement
5 de micro-organismes à partir d'un prélèvement, ainsi qu'à la détection de micro-organismes "cibles" au sein d'un mélange de micro-organismes. Sur ces milieux, les micro-organismes forment des colonies détectables à l'œil nu, et il est hautement souhaitable que les produits des activités
10 biochimiques recherchées restent localisés sur leur site de production. Cela permet en effet de distinguer une colonie de ses voisines si celles-ci n'expriment pas les mêmes activités. On peut ainsi utiliser diverses méthodes détectant par exemple des changements de pH
15 (FR-A-2 671 100), des activités d'estérases (FR-2 457 323), des activités d'osidases (FR-A-2 684 110) etc. Il est évidemment possible d'utiliser conjointement plusieurs de ces méthodes, afin de mettre en évidence plusieurs espèces ou souches, et/ou afin d'accroître la sensibilité et/ou la
20 spécificité de la détection.

Les brevets US-B-5210022 et US-B-5358854 décrivent des substrats chromogènes sensibles à l'action de la β -galactosidase. Ces substrats dérivés du 3-hydroxy indole sont par exemple des indolyl- β -D-galactosides dont le noyau
25 indole peut porter des substituants halogène en positions 4, 5, 6 ou 7.

Le document EP-A-0 224 830 décrit une méthode de détection de bactéries gram-négatives dans un échantillon d'urine, dans laquelle on ajoute à l'échantillon un extrait
30 naturel provenant de certaines espèces de crabes, puis, après incubation, on met en contact l'échantillon avec un support contenant un substrat peptidique qui comprend un

groupe partant chromogène. L'extrait naturel utilisé contient une proenzyme, et si l'échantillon contient des bactéries gram-négatives en nombre suffisant, les endotoxines de ces bactéries activent la proenzyme en une
5 enzyme capable de cliver le substrat peptidique avec formation d'un produit coloré sur le support.

On ne dispose pas actuellement de moyen, adapté aux milieux gélifiés, pour mettre en évidence des activités d'aminopeptidase et de peptidase de micro-organismes. En
10 effet, les substrats enzymatiques utilisés jusqu'à maintenant présentent l'inconvénient de libérer des molécules colorées ou fluorescentes qui diffusent dans les milieux gélifiés, ou qui ne sont révélées que par irradiation U.V. (cas de la naphtylamine ou de
15 l'aminocoumarine), ou qui nécessitent l'addition de réactifs (cas de la naphtylamine), ou dont la coloration est peu contrastée dans les milieux réactionnels utilisés en microbiologie (cas de la nitroaniline).

Dans la présente demande, une dénomination du type
20 (Acide aminé)-BIA ou (Peptide)-BIA désigne un composé du type 3-Acylamino-5-bromo-indole, dont l'acyle est celui dudit acide aminé ou dudit peptide.

On sait que la L-Leucine-aminopeptidase a été mise en évidence, dans des coupes histologiques de mammifères, grâce à un substrat enzymatique, le 3-L-leucylamino-5-bromo-indole, encore appelé L-Leucine-3-(5-bromo-indolamine), par abréviation L-Leu-BIA, qui produit après
25 hydrolyse un composé coloré ; voir PEARSON et al., 1963, Lab. Invest., 12 : 712. En 1967, YARBOROUGH et al., J. Reticuloendoth. Soc., 4 : 390 ont repris la technique de
30 PEARSON et al. dans des applications similaires (coupes histologiques). Ils ont précisé que l'ajout d'un mélange de

ferricyanure et de ferrocyanure de potassium, ou de sulfate de cuivre, inhibe la réaction.

En 1975 LOJDA et HAVRANKOVA, *Histochemistry*, **43** : 355 proposèrent d'améliorer la méthode utilisant le substrat
5 L--Leu-BIA par l'addition d'un mélange de sel de tétrazolium et de phénazine méthosulfate, la réaction colorée observée provenant alors de la réduction du sel de tétrazolium en formazan.

Le document WO-98/04735, publié après la date de
10 priorité dont bénéficie la présente demande, décrit l'utilisation d'un dérivé d'acylation de la 5-bromo indolamine, l'acyle étant choisi parmi les restes leucyle et alanyle, comme agent révélateur permettant de mettre en évidence, par formation d'un produit coloré, une activité
15 de peptidase dans une culture de micro-organismes.

Lors des travaux ayant conduit à la présente invention, on a recherché s'il était possible d'utiliser ce substrat enzymatique dans la détection de micro-organismes cultivés, notamment sur milieux gélifiés. Lors d'essais
20 préliminaires, on a ajouté de la L-Leu-BIA ou de la L-Pro-BIA, dans un milieu couramment utilisé pour la recherche d'osidases, qui est décrit à l'exemple 1 ci-après. Il n'a pas été possible de mettre en évidence une activité de leucine-aminopeptidase ou de proline-aminopeptidase, quel
25 que soit le micro-organisme cultivé dans ce milieu (notamment des genres *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*). L'ajout des réactifs proposés par LOJDA et HAVRANKOVA s'est traduit par une inhibition plus ou moins complète de la
30 croissance des micro-organismes, sans permettre la révélation d'une activité de peptidase avec la L-Leu-BIA ou la L-Pro-BIA.

En revanche, si l'on ajoute, dans ce même milieu de l'exemple 1, de la 7-L-leucylamino-4-méthyl-coumarine (L-Leu-AMC) ou de la 7-L-prolylamino-4-méthyl-coumarine (L-Pro-AMC), une fluorescence (et donc une activité de leucine-aminopeptidase ou de proline-aminopeptidase) est détectée avec certains de ces mêmes micro-organismes (voir l'exemple 1). De même, dans ce milieu, avec des substrats d'osidases (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside et 6-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide), on peut détecter les activités de β -galactosidase et de β -glucuronidase des micro-organismes.

Avec le milieu utilisé à l'exemple 2 ci-après, il n'a pas non plus été possible de mettre en évidence une activité de peptidase avec la L-Leu-BIA ou la L-Pro-BIA.

On a maintenant découvert que l'absence de résultats avec les dérivés d'indolamine n'était pas due à une incompatibilité avec les micro-organismes ou à une inhibition de leur multiplication en culture, mais était due essentiellement à des conditions de milieu. On a en effet découvert qu'il était possible de révéler l'activité de peptidase de micro-organismes avec les dérivés d'indolamine, en utilisant d'autres milieux de culture. Les raisons pour lesquelles certains milieux sont utilisables, et d'autres non, ne sont pas connues. Néanmoins, il est possible de déterminer et de mettre au point, par de simples essais de routine, semblables à ceux décrits dans la partie expérimentale ci-après, les milieux et/ou ingrédients qui conviennent ou qui ne conviennent pas. L'invention a donc d'abord consisté notamment à rechercher, et à montrer qu'il était possible de trouver, des milieux de culture dans lesquels les substrats de peptidases, dérivés d'indolamine, qui sont mentionnés ci-dessus, sont

utilisables pour mettre en évidence les activités enzymatiques correspondantes dans une culture de micro-organismes.

On a ainsi découvert notamment qu'un milieu utilisable
5 est le suivant, contenant :

- Extrait de levure 0,5-25 g/l
- Peptone de gélatine 0,5-25 g/l
- NaCl 0-50 g/l

et éventuellement :

10 - Agent régulateur de pH, quantité suffisante pour pH = 3
à 9

et/ou :

- Agent gélifiant 5-35 g/l

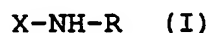
15 L'agent gélifiant est un agent gélifiant usuel, par
exemple l'agar.

Le pH choisi est un pH qui convient pour le micro-
organisme étudié. Dans le cas d'un milieu gélifié, le pH
est de préférence de 5 à 9. On peut ajuster le pH, par
20 exemple, avec de l'acide chlorhydrique ou du carbonate de
sodium.

Si on ajoute à un tel milieu, par exemple, de la
L-Pro-BIA, et si onensemence avec des micro-organismes, on
obtient des colonies brunes ou incolores suivant que les
25 micro-organismes expriment ou non une activité de L-
Proline-aminopeptidase.

Des résultats comparables ont été obtenus avec des
substrats du type 3-acylamino-indole dans lesquels l'acyle
est le reste acyle d'un acide aminé ou d'un peptide.

30 L'invention a donc pour objet l'utilisation d'au moins
un composé de formule (I) :



dans laquelle X représente un groupe indole-3-yle éventuellement substitué et R représente le reste acyle d'un acide aminé ou d'un peptide, le groupement amine ou les groupements amines présents dans R étant éventuellement
5 sous forme protégée, comme agent révélateur, ledit agent étant à ajouter à un milieu de culture de micro-organismes et permettant de mettre en évidence, par formation d'une coloration ou d'une fluorescence dans ledit milieu, soit une activité de peptidase dans ledit milieu de culture,
10 soit la présence d'un micro-organisme ou d'un groupe de micro-organismes exprimant une telle activité dans ledit milieu, à l'exception de l'utilisation d'un composé de formule (I) pour lequel X représente un groupe 5-bromo-indole-3-yle et R représente un reste leucyle ou alanyle.
15 Bien entendu, l'utilisation selon l'invention permet également, le cas échéant, de constater l'absence de l'activité de peptidase recherchée et/ou l'absence du ou des micro-organismes recherchés.

L'acide aminé ou le peptide dont R représente le reste
20 acyle répond à la formule RCOOH .

Dans les composés de formule (I), le groupement amine, ou les groupements amines présents dans R, et en particulier le groupement amine N-terminal, peuvent être, si désiré, sous forme protégée, notamment à l'aide des
25 groupements protecteurs temporaires des amines utilisés classiquement dans la chimie des peptides. La présence ou l'absence de tels groupements protecteurs est sans influence sur la formation d'un produit coloré ou fluorescent lorsque l'activité de peptidase recherchée est
30 présente dans le milieu de culture étudié.

Le groupement indolye représenté par X, dans la formule (I), peut comporter un ou plusieurs substituants en

l'une au moins des positions 1, 4, 5, 6 et 7. Lesdits substituants peuvent être choisis notamment parmi les substituants halogène, alkyle inférieur, aryle, aralkyle, alkoxy inférieur et aralkoxy. Dans la présente demande, les substituants alkyle inférieur et alkoxy inférieur, de même que les groupes alkyle des substituants aralkyle et aralkoxy, comportent notamment de 1 à 4 atomes de carbone. Les substituants halogènes peuvent être le fluor, le chlore, le brome et l'iode, en particulier le chlore et/ou le brome. Les substituants aryle sont notamment des groupes phényle éventuellement substitués par exemple par des groupes alkyle inférieur, halogène ou alkoxy inférieur. Le substituant éventuellement présent en position 1 est notamment un substituant alkyle inférieur, par exemple méthyle. Parmi les groupements indole-3-yle substitués représentés par X, on peut citer notamment les dérivés 4-chloro-, 6-chloro-, 5-bromo-, 1-méthyl-, 4-méthyl-, 5-méthyl-, 4,7-diméthyl-, 4,6-dichloro-, 6,7-dichloro-, 4-chloro-5-bromo-, 4,5,7-trichloro-, 4,6,7-trichloro-, 4-chloro-5-bromo-7-méthyl-, 5-méthoxy-, 5-benzyl-, 5-benzyloxy- et 5-phényl-indoles.

Dans la formule (I), lorsque le groupe R représente le reste acyle d'un acide aminé, il s'agit par exemple d'un reste alanyle, prolyle, leucyle, pyroglutamyle ou arginyle. Lorsque le groupe R représente le reste acyle d'un peptide, ce peptide peut comporter jusqu'à 10 résidus d'acides aminés, en particulier jusqu'à 5 résidus d'acides aminés, et notamment jusqu'à 3 résidus d'acides aminés. Parmi les peptides dont dérive le groupe R, on citera en particulier ceux dont le résidu d'acide aminé C-terminal est choisi parmi les résidus de leucine, d'alanine, de proline et d'arginine. On peut citer à titre d'exemple de peptide

l'alanyl-phénylalaniyl-proline, donnant des dérivés de formule (I) pour lesquels R représente Ala-Phé-Pro-.

Les composés de formule (I) sont solubles dans les milieux aqueux. Ils peuvent être préparés selon les méthodes habituellement utilisées en synthèse peptidique. On peut notamment faire réagir une indolamine de formule X-NH₂, X étant défini comme précédemment, avec un dérivé d'un acide aminé ou d'un peptide, ledit acide aminé ou ledit peptide répondant à la formule RH, R étant défini comme précédemment. Ledit dérivé d'acide aminé ou de peptide est un dérivé à groupement carboxyle activé et à groupement(s) amine protégé(s) à l'aide d'un groupement protecteur usuel des fonctions amine primaire. Le groupe carboxyle activé est un dérivé du groupe carboxyle qui facilite la formation d'amides par réaction avec les amines primaires, par exemple un groupe anhydride mixte. On sait que l'on peut obtenir un anhydride mixte en faisant réagir par exemple un acide avec un chloroformiate d'alkyle inférieur.

Les groupements protecteurs et leur utilisation sont bien connus ; voir par exemple R.A. BOISSONAS, Adv. in Organic Chemistry, Methods and Results, Vol.3, Interscience Publishers, 1963, pp.159 et suivantes. Dans le cas présent, on peut utiliser tous les groupements protecteurs des amines primaires utilisés notamment dans la chimie des peptides, par exemple le groupement N-Cbz (N-benzyloxycarbonyl) ou N-Boc (N-butyloxycarbonyl), dont on sait qu'ils sont des groupements protecteurs temporaires des groupements amine, ceux-ci pouvant être ensuite restaurés, si désiré, par une simple hydrolyse acide. Par réaction de l'indolamine de formule X-NH₂ avec le dérivé à groupement carboxyle activé et à groupement amine protégé, puis déprotection éventuelle du ou des groupement(s) amine,

on obtient le composé de formule (I). L'indolamine de formule $X-NH_2$ peut elle-même être obtenue notamment selon un procédé analogue à celui décrit par MADELUNG, Liebigs Annalen der Chemie, Vol.405, pp.58-95 (1914).

5 L'invention concerne également un procédé de mise en évidence d'une activité de peptidase dans une culture de micro-organismes, dans lequel on ajoute au milieu de culture desdits micro-organismes un agent révélateur de formule (I) tel que défini ci-dessus, et dans lequel on
10 recherche la formation éventuelle, dans le milieu de culture, d'un composé coloré, étant entendu que si un composé coloré s'est formé, l'activité de peptidase recherchée est présente, et elle est absente s'il n'y a pas formation d'un produit coloré. Dans le procédé de
15 l'invention, on utilise évidemment un milieu de culture sélectionné préalablement pour son aptitude à permettre la transformation d'un substrat de formule (I) en produit coloré lorsqu'une activité de peptidase correspondante est présente. On peut utiliser notamment un milieu tel que
20 celui mentionné ci-dessus.

Dans la présente demande, on appelle "produit coloré" un produit ayant une couleur propre lorsqu'il est éclairé, en lumière blanche par exemple, ou un produit émettant une fluorescence lorsqu'il est soumis à une irradiation par
25 l'ultraviolet ou par la lumière visible, et le mot "coloration" désigne aussi bien la présence d'un produit coloré, ayant une couleur propre lorsqu'il est éclairé en lumière blanche, que la présence d'un produit émettant une fluorescence sous l'influence d'une radiation de longueur
30 d'onde appropriée.

L'étape dans laquelle on recherche la formation éventuelle d'un composé coloré est évidemment mise en

œuvre, le cas échéant, au bout d'un temps de culture tel que les micro-organismes recherchés se sont suffisamment multipliés pour que l'activité de peptidase recherchée soit détectable, si elle est présente.

5 L'invention concerne aussi un milieu de culture de micro-organismes contenant, outre les ingrédients nécessaires à la culture des micro-organismes, au moins un composé de formule (I) tel que défini ci-dessus.

10 Les composés de formule (I) sont ajoutés, dans le milieu de culture, à une concentration suffisante pour permettre de détecter l'activité de peptidase recherchée. Pour cette détection, on recherche, soit à l'œil nu, soit à l'aide de moyens optiques appropriés, l'apparition d'une coloration ou, éventuellement, l'apparition d'une
15 fluorescence sous irradiation par l'ultraviolet ou par la lumière visible. Cette concentration suffisante peut être déterminée préalablement, dans chaque cas, par des expériences de routine. Le milieu de culture peut contenir par exemple de 25 à 2000 mg/L du composé de formule (I).

20 L'un des avantages des composés de formule (I) est que les produits colorés qu'ils forment en présence d'une activité de peptidase ne diffusent pas dans les milieux de culture gélifiés.

Ils peuvent donc être utilisés en milieu gélifié. Ils
25 peuvent aussi, bien entendu, être utilisés en milieu liquide.

Par ailleurs, les substrats de formule (I) n'inhibent pas la multiplication des micro-organismes dans les milieux de culture. On peut donc les utiliser en les ajoutant au
30 milieu de culture à tout moment, y compris, si désiré, avant le début de la culture, en début de culture, ou en fin de culture. Dans le cas d'un milieu gélifié, il est

évidemment préférable d'introduire le composé de formule (I) lors de la préparation du milieu de culture, avant gélification dudit milieu.

L'invention concerne un procédé de détection d'un
5 micro-organisme ou d'un groupe de micro-organismes, dans un échantillon les contenant ou susceptible de les contenir. Ce procédé comprend les étapes consistant à ajouter à un milieu de culture contenant l'échantillon au moins un composé de formule (I) tel que défini ci-dessus, à
10 rechercher la formation éventuelle d'un produit coloré ou fluorescent dans ledit milieu, et à comparer, le cas échéant, la coloration ou la fluorescence obtenue à celle obtenue avec un échantillon authentique du micro-organisme ou du groupe de micro-organismes recherché. Dans un tel
15 procédé, la détection est évidemment fondée sur l'expression ou l'absence d'expression, par le micro-organisme ou par le groupe de micro-organismes recherché, de l'activité de peptidase que l'agent révélateur de formule (I) utilisé permet de mettre en évidence.

20 Selon un mode de réalisation particulier du procédé de détection de micro-organismes selon l'invention, on peut ajouter à la culture, en outre, au moins un agent révélateur additionnel permettant de détecter, par formation d'un produit coloré ou fluorescent, une activité
25 enzymatique, qui peut être la même que celle qui est mise en évidence à l'aide des composés de formule (I) tels que définis ci-dessus, mais qui est généralement une activité enzymatique différente de celle mise en évidence à l'aide des composés de formule (I). Il peut s'agir par exemple
30 d'une activité d'estérase, d'osidase ou de peptidase. On peut ainsi obtenir des informations supplémentaires, en liaison avec une absence de coloration (ou de fluorescence)

ou en liaison avec une coloration modifiée par rapport à la coloration obtenue avec un seul substrat enzymatique. L'autre agent révélateur choisi aura des propriétés différentes de celles des dérivés d'indolamine de formule (I) : par exemple, on choisira un autre agent révélateur capable de donner un produit réactionnel ayant une couleur différente de la couleur produite par l'indolamine de formule (I). L'autre agent révélateur (ou second agent révélateur) permettra donc de révéler, grâce à sa couleur propre, ou grâce à sa fluorescence, la présence d'une activité enzymatique dont il est spécifique. Si l'activité de peptidase révélable par les dérivés d'indolamine de formule (I) est également présente, on obtiendra une coloration modifiée, différente de la coloration donnée par le composé de formule (I) lorsqu'il est utilisé seul, et différente aussi de ladite couleur propre donnée par le second agent révélateur. Des exemples d'utilisation de plusieurs substrats, ainsi que les informations qui peuvent en ressortir, sont donnés ci-après dans la partie expérimentale. Bien entendu, les résultats peuvent varier avec chaque espèce ou souche de micro-organisme étudié. Chaque cas susceptible d'intérêt doit donc faire l'objet d'études préalables, selon des expériences de routine.

Les dérivés servant à mettre en évidence des activités enzymatiques différentes, et utilisables comme agents révélateurs additionnels, sont des agents révélateurs connus, ou leurs analogues. Ce sont notamment des dérivés d'indoxyle, de coumarine, de résorufine, de naphthol, de naphtylamine, de nitrophénol, de nitroaniline, de rhodamine, d'hydroxyquinoléine, de fluorescéine, etc.

Parmi ces agents révélateurs additionnels qui peuvent être utilisés en association avec les dérivés d'indolamine,

on peut citer notamment le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide, le 6-chloro-3-indolyl- β -D-glucoside, la L-alanine-7-amino-4-méthyl-coumarine, le 4-méthyl-umbelliféryl-N-acétyl- β -D-galacto-saminide, le résorufine- β -D-galactoside, le sulfate de β -naphtyle, le naphthol AS-BI β -D-galactoside, le L-alanine β -naphtylamide, l'o-nitro-phénol- β -D-galactoside, le carboxyben-zoyl-L-arginine-p-nitroanilide, la rhodamine 110 bis-(L-leucine amide), l'hydroxyquinoléine- β -D-glucoside, et le diacétate de fluorescéine.

Les caractéristiques et avantages de l'invention sont illustrés par les exemples suivants.

Exemple 1

15

Le milieu de culture contient, outre de l'eau :

- Peptone de viande \otimes 15 g/l
 - Peptone de caséine \otimes 3 g/l
 - NaCl 5 g/l
 - 20 - Tampon Tris 0,5 g/l
 - Na_2HPO_4 1 g/l
 - Citrate de sodium 1 g/l
 - Glucose 1 g/l
 - Pyruvate de sodium 2 g/l
 - 25 - Agar 13 g/l
- \otimes commercialisé par : D.I.F.C.O.
 \otimes commercialisé par : D.I.F.C.O.

A ce milieu, on ajoute soit de la L-Pro-BIA, soit de la 7-L-prolyl-amino-4-méthyl-coumarine (L-Pro-AMC), à une concentration de 200 mg/l. On enseme les différents

milieux obtenus, répartis dans des boîtes de Petri, avec des micro-organismes. Les boîtes ont été mises en incubation à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement à la lumière ambiante et sous lampe U.V. (longueur d'onde = 365 nm) après 24 et 48 heures d'incubation. La couleur ou la présence de fluorescence ont été notées. Les micro-organismes étudiés étaient : *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*.

Après 24 heures ou 48 heures de culture, on n'observe aucune coloration dans les cultures contenant de la L-Pro-BIA, bien que ces cultures renferment une activité de L-Pro-peptidase qui peut être mise en évidence dans les cultures contenant de la L-Pro-AMC : on observe alors l'émission d'une fluorescence sous irradiation U.V.

Quand on ajoute au milieu ci-dessus soit de la L-Ala-BIA, soit de la L-Leu-BIA, soit de la L-Alanine-7-amino-4-méthyl-coumarine (L-Ala-AMC), soit de la L-Leucine-7-amino-4-méthyl-coumarine (L-Leu-AMC), à des concentrations de 200 mg/L, on n'observe, après 24 heures ou 48 heures de culture, aucune coloration dans le cas des dérivés de bromoindolamine (BIA). En revanche, avec les dérivés d'aminométhylcoumarine (AMC), on a pu révéler la présence des activités de L-Alanine-aminopeptidase et de L-Leucine-aminopeptidase dans le cas d'*Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecium*, et *Streptococcus pyogenes*, et une absence de ces activités avec *Staphylococcus epidermidis*.

Exemple 2

Dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,3 à 25°C on ajoute soit de la L-Pro-BIA, soit de la L-Pro-AMC, à la concentration de 400 mg/L. Le milieu obtenu est réparti dans les puits de plaques de microtitration que l'on ensemence avec des suspensions de *P. aeruginosa* ou de *C. albicans*. Les plaques sont mises en incubation pendant 24 heures à 37°C. Les puits sont examinés visuellement à la lumière ambiante et sous lampe U.V., après 24 à 48 heures d'incubation.

Aucune coloration n'a été notée avec la L-Pro-BIA, bien qu'il soit possible de mettre en évidence une activité de L-Pro-aminopeptidase dans des puits dans lesquels on a remplacé la L-Pro-BIA par la L-Pro-AMC.

De façon analogue, l'addition de L-Leu-BIA au tampon phosphate mentionné ci-dessus n'a pas permis de détecter une activité de L-Leucine-aminopeptidase dans les cultures de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *P. aeruginosa*, *S. agalactiae*, *E. faecium* et *S. pyogenes*, alors que cette activité est détectée, par émission de fluorescence après 24 à 48 heures, pour ces mêmes bactéries, dans le même tampon additionné de L-Leu-AMC.

25 Exemple 3

Le milieu de culture contient, outre de l'eau :

- Extrait de levure ① 6 g/l
- Peptone de gélatine ② 5 g/l
- 30 - NaCl 8 g/l
- Na₂CO₃ 0,1 g/l
- Agar 13 g/l

⊙ commercialisé par BIO MERIEUX

⊗ BIO-GELYTONE commercialisé par BIO MERIEUX

A ce milieu, on ajoute soit la L-Pro-BIA, soit la
5 pyroglutamyl-BIA (Pyr-BIA), soit la Ala-Phe-Pro-BIA. On
ensemence ces différents milieux, répartis en boîtes de
Petri, avec divers micro-organismes : *E. coli*,
K. pneumoniae, *C. freundii*, *P. aeruginosa*, *S. agalactiae*,
E. faecium, *S. pyogenes*, *S. epidermidis*, *C. albicans* et
10 *C. tropicalis*. Les boîtes sont mises en incubation à 37°C
pendant 48 heures, et les colonies formées sont examinées
visuellement après 24 et 48 heures d'incubation. La couleur
a été notée. Les résultats sont présentés dans le tableau 1
ci-après :

TABLEAU 1

Souches		L-Pro-BIA	Pyr-BIA	Ala-Phe-Pro-BIA
<i>E. coli</i>	24 H	- ¹	-	Brun ²
Gram -	48 H	-	-	Brun
<i>K. pneumoniae</i>	24 H	-	-	Brun-
Gram -	48 H	-	Brun	Brun
<i>C. freundii</i>	24 H	-	-	Brun
Gram -	48 H	-	Brun	Brun
<i>P. aeruginosa</i>	24 H	Brun	Brun	Brun
Gram -	48 H	Brun	Brun	Brun
<i>S. agalactiae</i>	24 H	NT ³	-	Brun
Gram +	48 H	NT	-	Brun
<i>E. faecium</i>	24 H	NT	Brun	-
Gram +	48 H	NT	Brun	-
<i>S. pyogenes</i>	24 H	NT	Brun	Brun
Gram +	48 H	NT	Brun	Brun
<i>S. epidermidis</i>	24 H	NT	-	NT
Gram +	48 H	NT	-	NT
<i>C. albicans</i>	24 H	Brun	NT	NT
	48 H	Brun	NT	NT
<i>C. tropicalis</i>	24 H	-	NT	NT
	48 H	-	NT	NT

¹ : - = absence de coloration

² : Brun = couleur des colonies

³ : NT = Non testé

5

Dans le milieu utilisé pour cet exemple, il est donc possible de mettre en évidence des activités de L-Proline-aminopeptidase, Pyroglutamyl-aminopeptidase et Alanine-Phénylalanine-Proline-peptidase avec la L-Pro-BIA, la Pyr-BIA et la Ala-Phe-Pro-BIA, respectivement. On peut notamment distinguer les bactéries de l'espèce *E. faecium* (colonies incolores avec Ala-Phe-Pro-BIA) des bactéries du genre *Streptococcus* étudiées (coloration brune avec Ala-Phe-Pro-BIA). On peut aussi distinguer l'espèce *P. aeruginosa* (colonies brunes avec L-Pro-BIA) des autres bactéries à Gram négatif étudiées. On peut en outre

10

15

distinguer les souches de levure de l'espèce *C. albicans* (colonies brunes avec L-Pro-BIA) de celles de l'espèce *C. tropicalis*.

On a obtenu des résultats identiques avec un milieu
5 analogue liquide, sans agar.

Exemple 4

Dans le milieu de l'exemple 3, on a incorporé soit de
10 la L-Pro-BIA soit de la Pyr-BIA, seules ou en combinaison
avec soit du 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucoside (X-Glu)
soit du 6-Chloro-3-indolyl- β -D-glucoside (Z-Glu) soit
du 4-Méthylumbelliféryl- β -D-glucoside (MUGl). On ensemence
ces différents milieux répartis en boîtes de Petri avec des
15 micro-organismes. Les boîtes ont été mises en incubation à
37°C pendant 48 heures, et les colonies formées ont été
examinées visuellement à la lumière ambiante et sous lampe
U.V. (longueur d'onde = 365nm). Les couleurs des colonies
obtenues après 24 et 48 heures d'incubation sont présentées
20 dans le tableau 2 :

TABLEAU 2

		L-Pro-BIA				Pyr-BIA			
			X-Glu	Z-Glu	MUGl		X-Glu	Z-Glu	MUGl
Souches	T** N*	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>E. coli</i> Gram -	24 H	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 H	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> Gram -	24 H	-	Bleu	Rose	Fluo	-	Bleu	Rose	Fluo
	48 H	-	Bleu	Rose	Fluo	Brun	Bleu-Gris	Gris-Rose	Brun+Fluo
<i>C. freundii</i> Gram -	24 H	-	Bleu	Rose	Fluo	-	Bleu	Rose	Fluo
	48 H	-	Bleu	Rose	Fluo	Brun	Bleu-Gris	Gris-Rose	Brun+Fluo
<i>P. aeruginosa</i> Gram -	24 H	Brun	Brun	Brun	Brun	Brun	Brun	Brun	Brun
	48 H	Brun	Brun	Brun	Brun	Brun	Brun	Brun	Brun
<i>S. agalactiae</i> Gram +	24 H	NT	NT	NT	NT	-	-	-	-
	48 H	NT	NT	NT	NT	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> Gram +	24 H	NT	NT	NT	NT	Brun	Bleu-Gris	Gris-Rose	Brun+Fluo
	48 H	NT	NT	NT	NT	Brun	Bleu-Gris	Gris-Rose	Brun+Fluo
<i>S. pyogenes</i> Gram +	24 H	NT	NT	NT	NT	Brun	Brun	Brun	Brun
	48 H	NT	NT	NT	NT	Brun	Brun	Brun	Brun
<i>C. albicans</i>	24 H	Brun	Brun	Brun	Brun	NT	NT	NT	NT
	48 H	Brun	Brun	Brun	Brun	NT	NT	NT	NT
<i>C. tropicalis</i>	24 H	-	-	Rose	Fluo	NT	NT	NT	NT
	48 H	-	Bleu	Rose	Fluo	NT	NT	NT	NT

N* : N° du milieu

T** : temps de culture

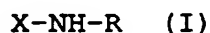
- : absence de coloration

NT : non testé.

Sur les milieux 2, 3 et 4, il est possible de distinguer après 24 heures d'incubation *E. coli* (absence de coloration) et *P. aeruginosa* (coloration brune) des autres bactéries à Gram négatif. Sur ces milieux, il est également possible de distinguer *C. albicans* de *C. tropicalis*, les deux espèces produisant des colonies de couleurs différentes. Les milieux 6, 7, et 8 permettent la distinction entre *S. agalactiae* et les espèces *E. faecium* et *S. pyogenes*, les souches de *S. agalactiae* donnant des colonies incolores et celles des deux autres espèces donnant des colonies colorées. Après 24 heures d'incubation, on peut en outre, grâce à leur couleur caractéristique (variable suivant le milieu), distinguer les bactéries *E. faecium* des autres bactéries étudiées.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un composé de formule (I) :



5 dans laquelle X représente un groupe indole-3-yle éventuellement substitué et R représente le reste acyle d'un acide aminé ou d'un peptide, le groupement amine, ou les groupements amines, présents dans R, étant éventuellement sous forme protégée, comme agent révélateur,
10 ledit agent révélateur étant à ajouter à un milieu de culture et permettant de mettre en évidence, par formation d'une coloration ou d'une fluorescence dans ledit milieu, soit une activité de peptidase dans une culture de micro-organismes, soit la présence d'un micro-organisme ou d'un
15 groupe de micro-organismes exprimant une telle activité dans ledit milieu, à l'exception de l'utilisation d'un composé de formule (I) pour lequel X représente un groupe 5-bromo-indole-3-yle et R représente un reste leucyle ou alanyle.

20 2. Utilisation selon la revendication 1 dans laquelle R représente le reste acyle d'un acide aminé, ou le reste acyle d'un peptide comportant jusqu'à 10 résidus d'acides aminés.

3. Utilisation selon la revendication 2, dans laquelle
25 ledit peptide comporte jusqu'à 5 résidus d'acides aminés et en particulier jusqu'à 3 résidus d'acides aminés.

4. Utilisation selon la revendication 2 ou 3, dans laquelle R représente le reste acyle du peptide Ala-Phé-Pro-.

30 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, dans laquelle le résidu d'acide aminé

C-terminal dudit peptide est un résidu de leucine, d'alanine, de proline ou d'arginine.

5 6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, dans laquelle R représente un reste alanyle, prolyle, leucyle, pyroglutamyle, ou arginyle.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle X représente un groupement indole-3-yle substitué en l'une au moins des positions 1, 4, 5, 6 et 7 dudit groupement indole.

10 8. Utilisation selon la revendication précédente, dans laquelle X représente un groupe 5-bromo-indole-3-yle.

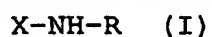
9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle ledit milieu de culture est un milieu gélifié.

15 10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle ledit milieu de culture est un milieu liquide.

20 11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle on ajoute en outre au milieu de culture au moins un autre agent révélateur permettant de détecter, par formation d'un produit coloré ou fluorescent, une activité enzymatique.

25 12. Utilisation selon la revendication 11, dans laquelle ledit autre agent révélateur permet de détecter une activité enzymatique différente de celle mise en évidence à l'aide de l'agent révélateur de formule (I).

30 13. Procédé de mise en évidence d'une activité de peptidase dans un milieu de culture de micro-organismes, comprenant les étapes consistant à ajouter au milieu de culture au moins un composé de formule (I) :



dans laquelle X représente un groupe indole-3-yle éventuellement substitué et R représente le reste acyle d'un acide aminé ou d'un peptide, le groupement amine, ou les groupements amines, présents dans R, étant
5 éventuellement sous forme protégée, à l'exception d'un composé de formule (I) pour lequel X représente un groupe 5-bromo-indole-3-yle et R représente un reste leucyle ou alanyle,

et à rechercher la formation éventuelle d'un produit coloré
10 ou fluorescent dans ledit milieu, étant entendu que la formation ou l'absence de formation d'un produit coloré ou fluorescent permet de conclure à la présence ou à l'absence, respectivement, de ladite activité de peptidase.

14. Procédé de détection d'un micro-organisme ou d'un
15 groupe de micro-organismes dans un échantillon les contenant ou susceptible de les contenir, comprenant les étapes consistant à ajouter à un milieu de culture contenant l'échantillon au moins un composé de formule (I) :

20
$$X-NH-R \quad (I)$$

dans laquelle X représente un groupe indole-3-yle éventuellement substitué et R représente le reste acyle d'un acide aminé ou d'un peptide, le groupement amine, ou les groupements amines, présents dans R, étant
25 éventuellement sous forme protégée, à l'exception d'un composé de formule (I) pour lequel X représente un groupe 5-bromo-indole-3-yle et R représente un reste leucyle ou alanyle,

à rechercher la formation éventuelle d'un produit coloré ou
30 fluorescent dans ledit milieu de culture,
et à comparer, le cas échéant, la coloration ou la fluorescence obtenue à celle obtenue avec un échantillon

authentique du micro-organisme ou du groupe de micro-organismes recherché.

15. Procédé selon la revendication 13 ou 14, dans lequel ledit composé de formule (I) est tel que défini dans
5 l'une quelconque des revendications 2 à 8.

16. Procédé selon la revendication 13, 14 ou 15, dans lequel on ajoute ledit composé de formule (I) au milieu de culture avant le début d'une étape de culture ou au début d'une étape de culture dudit micro-organisme ou dudit
10 groupe de micro-organismes susceptible d'être présent dans ledit échantillon.

17. Procédé selon la revendication 16, dans lequel ledit milieu de culture est un milieu gélifié, et dans lequel on introduit le composé de formule (I) lors de la
15 préparation du milieu de culture, avant la gélification dudit milieu.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/00166

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/04 C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 224 830 A (MILES LAB) 10 June 1987 see page 3, line 21 - line 23 see page 7, line 37 - line 47 see page 10, line 47 - page 12, line 20	1-3,5,6, 9-17
Y	DE 41 19 956 A (FANGHAENEL SILVIA DIPL BIOCHEM) 24 December 1992 see tables 1,2	1-3,5,6, 9-17
A	LOJDA Z ET AL: "THE HISTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF AMINOPEPTIDASE WITH BROMOINDOLYL LEUCINAMIDE". HISTOCHEMISTRY, vol. 43, no. 4, 1975, pages 355-366, XP000671121 cited in the application see the whole document	7,8

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 April 1999

Date of mailing of the international search report

16/04/1999

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/00166

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	D J YARBOROUGH, O T MEYER; A M DANNENBERG, B PEARSON: "Histochemistry of Macrophage Hydrolases" JOURNAL OF THE RETICULOENDOTHELIAL SOCIETY, vol. 4, 1967, pages 390-408, XP002084546 cited in the application see page 390 - page 391 see page 393, paragraph 3 - page 394, paragraph 1 see page 400 - page 402 -----	7,8
A	FR 2 708 286 A (RAMBACH ALAIN) 3 February 1995 see the whole document -----	1,11,12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No
PCT/FR 99/00166

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0224830 A	10-06-1987	US 4717658 A AT 60136 T AU 576102 B AU 6583086 A CA 1292175 A DK 114692 A DK 579686 A FI 864890 A,B, IE 59008 B JP 6341993 A JP 1916125 C JP 6048272 B JP 62134563 A NO 173744 C	05-01-1988 15-02-1991 11-08-1988 04-06-1987 19-11-1991 17-09-1992 04-06-1987 04-06-1987 15-12-1993 13-12-1994 23-03-1995 22-06-1994 17-06-1987 26-01-1994
DE 4119956 A	24-12-1992	NONE	
FR 2708286 A	03-02-1995	AT 163972 T CA 2168114 A DE 69408993 D DE 69408993 T EP 0711360 A ES 2114697 T WO 9504157 A JP 9500791 T	15-03-1998 09-02-1995 16-04-1998 01-10-1998 15-05-1996 01-06-1998 09-02-1995 28-01-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale No
PCT/FR 99/00166

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12Q1/04 C12Q1/37		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12Q G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 224 830 A (MILES LAB) 10 juin 1987 voir page 3, ligne 21 - ligne 23 voir page 7, ligne 37 - ligne 47 voir page 10, ligne 47 - page 12, ligne 20 ---	1-3,5,6, 9-17
Y	DE 41 19 956 A (FANGHAENEL SILVIA DIPL BIOCHEM) 24 décembre 1992 voir tableaux 1,2 ---	1-3,5,6, 9-17
A	LOJDA Z ET AL: "THE HISTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF AMINOPEPTIDASE WITH BROMOINDOLYL LEUCINAMIDE" HISTOCHEMISTRY, vol. 43, no. 4, 1975, pages 355-366, XP000671121 cité dans la demande voir le document en entier. --- <div style="text-align: center;">-/-</div>	7,8
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center;">6 avril 1999</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center;">16/04/1999</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">Hart-Davis, J</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 99/00166

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>D J YARBOROUGH, O T MEYER, A M DANNENBERG, B PEARSON: "Histochemistry of Macrophage Hydrolases" JOURNAL OF THE RETICULOENDOTHELIAL SOCIETY, vol. 4, 1967, pages 390-408, XP002084546 cité dans la demande voir page 390 - page 391 voir page 393, alinéa 3 - page 394, alinéa 1 voir page 400 - page 402</p>	7,8
A	<p>FR 2 708 286 A (RAMBACH ALAIN) 3 février 1995 voir le document en entier</p>	1,11,12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den 3 Internationale No
PCT/FR 99/00166

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0224830 A	10-06-1987	US 4717658 A	05-01-1988
		AT 60136 T	15-02-1991
		AU 576102 B	11-08-1988
		AU 6583086 A	04-06-1987
		CA 1292175 A	19-11-1991
		DK 114692 A	17-09-1992
		DK 579686 A	04-06-1987
		FI 864890 A,B,	04-06-1987
		IE 59008 B	15-12-1993
		JP 6341993 A	13-12-1994
		JP 1916125 C	23-03-1995
		JP 6048272 B	22-06-1994
		JP 62134563 A	17-06-1987
		NO 173744 C	26-01-1994
DE 4119956 A	24-12-1992	AUCUN	
FR 2708286 A	03-02-1995	AT 163972 T	15-03-1998
		CA 2168114 A	09-02-1995
		DE 69408993 D	16-04-1998
		DE 69408993 T	01-10-1998
		EP 0711360 A	15-05-1996
		ES 2114697 T	01-06-1998
		WO 9504157 A	09-02-1995
		JP 9500791 T	28-01-1997